

# 内在性抗酸化システム活性化を検出・定量できる培養細胞系の構築 とポリフェノール類のスクリーニング

## 【助成対象者】

鳥取大学医学部病態解析医学講座統合分子医化学分野  
中曾一裕

## 【共同研究者】

鳥取大学医学部病態解析医学講座統合分子医化学分野  
堀越洋輔

## 【研究の目的】

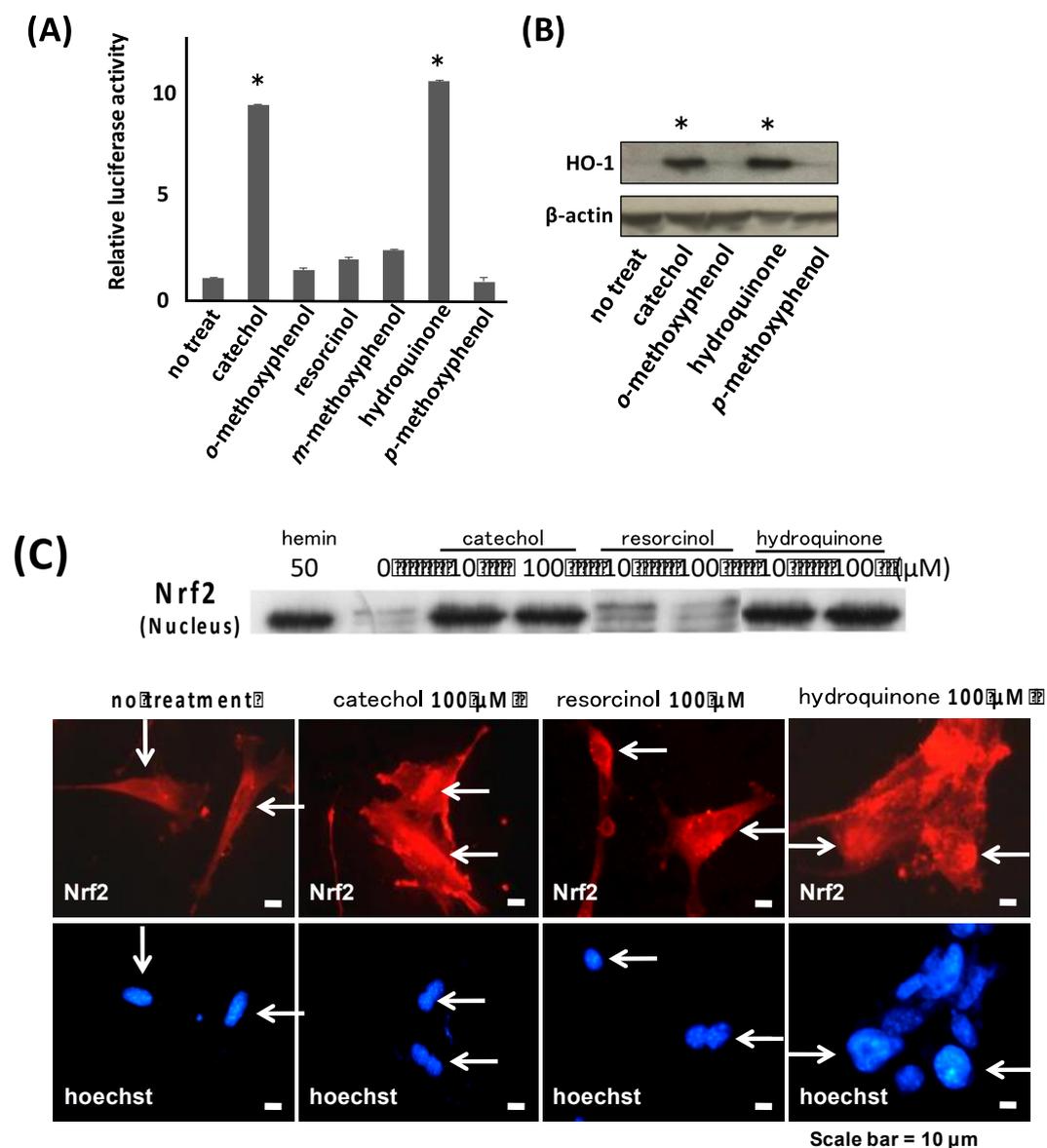
脳の老化や種々の神経変性疾患の病態に酸化ストレスが深く関与することは古くから知られている。しかし自然界に存在する抗酸化物質をはじめ、人工的に作られた薬剤も含め、各種抗酸化剤では老化や各種疾患を予防・治療できないのが現実である。近年、生体内の抗酸化システムを調節する転写因子 Nrf2 に注目が集まっている。Nrf2 は複数の内在性抗酸化システムを活性化できるため、互いに酸化還元のリサイクルシステムを構築し、長時間にわたり抗酸化機能を発揮出来るという利点がある。本研究では“転写因子 Nrf2 による内在性抗酸化機能活性化”を健康、老化防止、疾患予防に応用することを目標に、培養細胞による Nrf2 活性化検出システムを構築し、食品成分を中心に Nrf2 活性化成分のスクリーニングを行う。一連の研究の中で、どのような食品成分に Nrf2 活性化能があるのかを明らかにし、Nrf2 活性化成分の共通分子構造を明らかにする。それにより将来的には食品成分によるアンチエイジング、疾患予防につながる知見の蓄積を目的とする。

## 【研究の成果】

### 1. 転写因子 Nrf2 活性化検出用コンストラクト導入細胞の作成

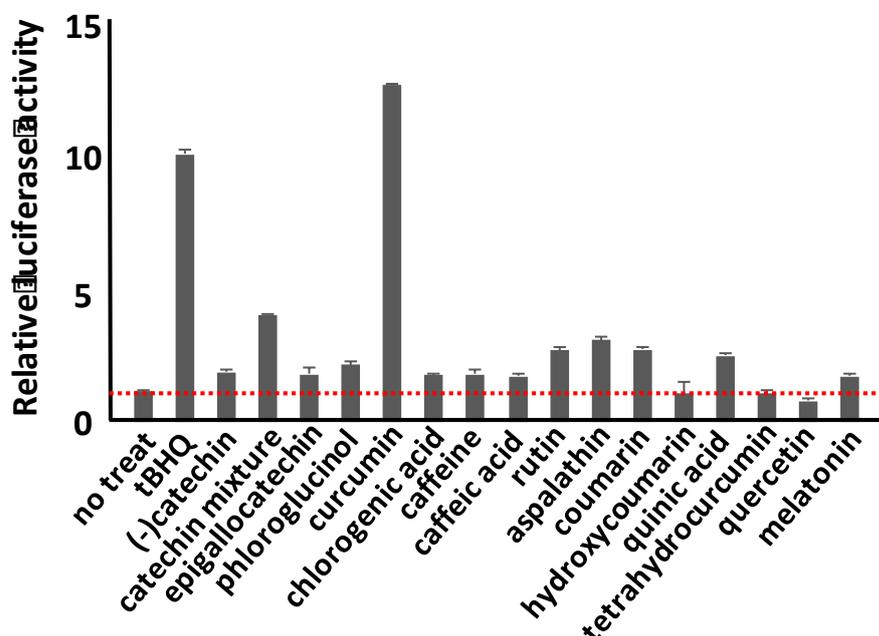
Nrf2 が種々の抗酸化分子の遺伝子上流プロモーター領域の Antioxidant Response Element (ARE) に結合することを利用し、Nrf2 の活性化状況を可視化する目的で ARE と検出系遺伝子 (ルシフェラーゼ) を組み込んだベクターを培養細胞に導入した。培養細胞はヒト肝臓癌細胞 HepG2, ヒト神経げ細胞種由来 SH-SY5Y, マウスマクロファージ由来 Raw 細胞を用いた。同様に比較対象として転写因子 AP-1 結合配列を組み込んだベクター導入細胞も合わせて作成した。作成した細胞の中では、HepG2 細胞の感度が Nrf2, AP-1 何の転写因子の活性化システムにおいても優れていた。以下に、HepG2-Nrf2 活性化検出細胞を用いた結果を示す。カテコール、ヒドロキノン は Nrf2 活性化を示し (Fig 1A), 両成分は Nrf2 下流分子 HO-1 の発現を誘導し (Fig 1B), さらに Nrf2 核内移行を誘導していた (Fig 1C)。このことから、概ね Nrf2 活性化検出系で活性化を示したポリフェノール類は、HO-1 発現, Nrf2 活性化を誘導しており、確立した細胞系が機能することが示された。

Fig1



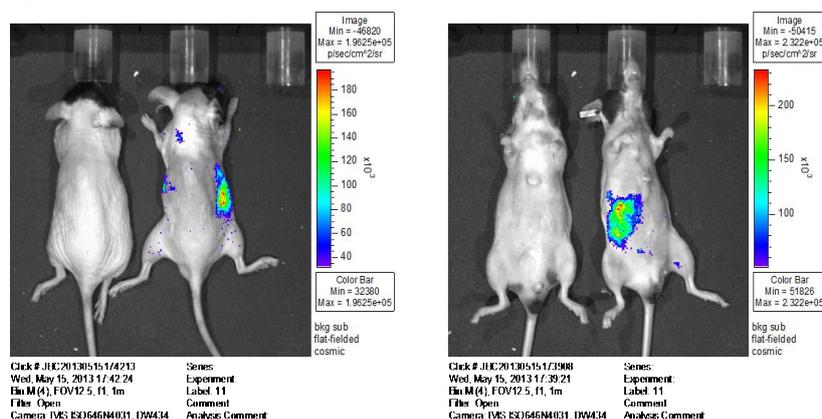
次に、確立した細胞系を用い、食品等に含まれるポリフェノールおよび関連物質の Nrf2 活性化能を検討した。Fig.2 に示すように、緑茶抽出カテキン混合物や、各種ポリフェノールなどで Nrf2 活性化を示した。ポリフェノール類の中で、Nrf2 活性化を示したものの共通構造として、カテコール構造、ヒドロキノン構造を有するものが Nrf2 を活性化する傾向が示された。

Fig2



さらにスクリーニング結果を元に、別途用意した Nrf2 活性化検出マウスにコエンザイム Q10 (ヒドロキノンをもつ) を腹腔内投与したところ、主に肝臓で Nrf2 活性化が検出され、スクリーニング結果を個体レベルでも再現できることを確認した(Fig 3).

Fig3

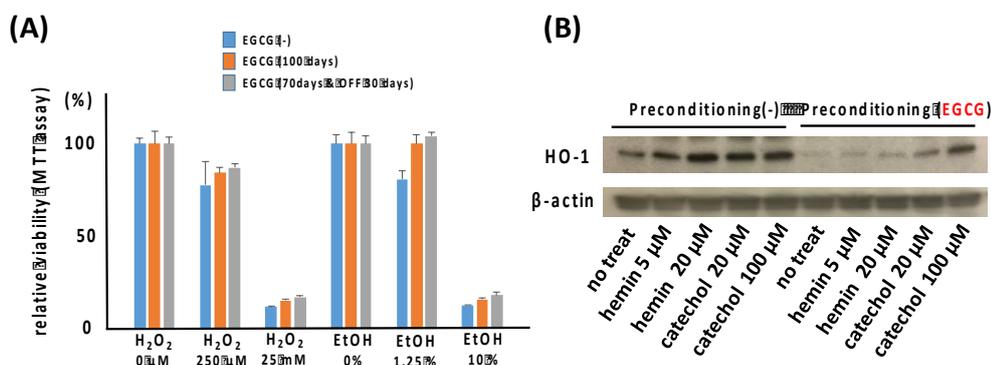


OKD48mouse/CoQ10.p.18h

細胞は反復した刺激を受けた際に、ゲノムが修飾され (エピゲノム変化), 後に暴露される刺激に対し耐性を示したり, 脆弱性を示すことがある. 申請者は以前, 反復する LPS (リポポリサッカライド) 刺激によりマウスの肝臓で Nrf2 活性化が増強 (発現量が増加) されることを見出している. このことから, ポリフェノール類による反復長期暴露で同様の Nrf2 活性化増強が生じると仮定し, 低濃度のエピガロカテキンを 5 ヶ月にわたり継続的に HepG2 に与え, その細胞を用いてより感度の高い Nrf2 活性化検出システムを作ることを考えた. 長期エピガロカテキン (EGCG) 暴露は酸化ストレス, アルコ

ールに対する耐性を示したが(Fig 4A), Nrf2 活性化 ( HO-1 誘導) はむしろ抑制されており (Fig 4B), 当初予定したさらなる高感度の Nrf2 活性化検出システムは断念した. すなわち, 長期 EGCG 暴露による耐性獲得は Nrf2 とは別のシステムが関与していると考えられた.

Fig 4



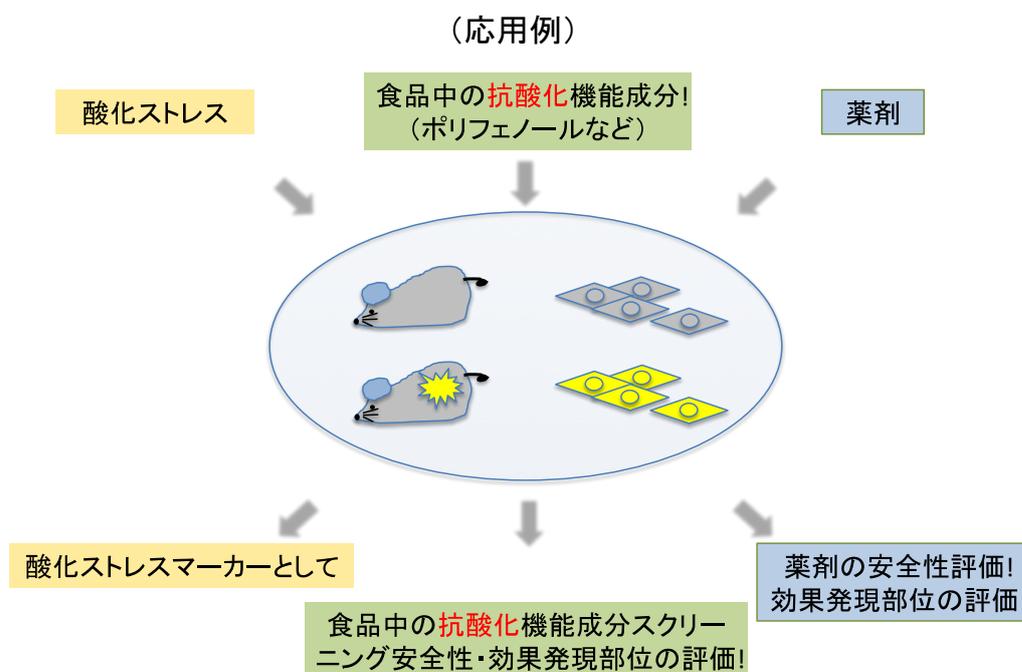
### 【今後の課題】

Nrf2 活性化を検出できる培養細胞系を確立したが, 現時点では主に純品としてのポリフェノール類で検討を行っている. 今後は食品等の粗抽出物を用いた検討を行い, その中に含まれる Nrf2 活性化成分を分離していく研究を予定している.

また, 培養細胞で得られた結果全てが必ずしも消化管吸収や体内での代謝を受け得る個体内において再現されるかどうかは不明である. この点は, 培養細胞としてのスクリーニングと, Nrf2 活性化検出マウスを用いた検討を並行して行っていく必要がある.

# 食品の機能性・医薬品の安全性評価

内在性抗酸化システムのマスター転写因子Nrf2の活性化状況を  
可視化出来るシステムの構築



## 【本研究に関する主な発表論文、投稿等】

報告書作成時点での論文投稿はありません。